

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02733

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12Q1/68,
 G01N33/50 // A61K31/00, A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl⁷ C12N15/11-15/62, C07K14/00-14/825

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,
 BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICST FILE(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Holroyd, Kenneth J. et al., "Asthma and Bronchial Hyper-responsiveness Linked to the XY Long Arm Pseudoautosomal Region", <i>Genomics</i> , September 1, 1998, Volume 52, Number 2, pp.233-235	1-4,10-20
P,A	TAKABAYASHI, Akira et al., "Novel polymorphism in the 5'-untranslated region of the interleukin-4 gene", <i>Journal of Human Genetics</i> , 1999, Volume 44, Number 5, pp. 352-353	1-4,10-20
A	Kazushi Honda, "Sugi Kafun Sho no Meneki Idengaku Teki Kaiseki HLA to rensha shita Sugi Kafun Kogen ni taisuru Meneki Yokusei Idenshi no Shoumei to Kaiseki", <i>Fukuoka Igaku Zasshi</i> , 25 January, 1989, Vol. 80, No.1, pp.28-37	1-4,10-20
A	Mitsuru Munakata, " β -adrenalin Juyotai Idenshi", <i>Gendai Iryo</i> , 10 March 1998, Vol.30, No.3, pp.863-867	1-4,10-20
P,A	JP, 11-332567, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 07 December, 1999 (07.12.99) (Family: none)	1-4,10-20

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 August, 2000 (02.08.00)	Date of mailing of the international search report 15 August, 2000 (15.08.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12Q 1/68, G01N 33/50 // A61K 31/00, A61P 37/00		A1	(11) 国際公開番号 WO00/65049
			(43) 国際公開日 2000年11月2日 (02.11.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02733			
(22) 国際出願日 2000年4月26日 (26.04.00)			
(30) 優先権データ 特願平11/120491 1999年4月27日 (27.04.99)	JP		
(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 株式会社 ジェノックス創薬研究所 (GENOX RESEARCH, INC.)[JP/JP] 〒300-2635 茨城県つくば市東光台5-1-3 Ibaraki, (JP)			柏原智子(KASHIWABARA, Tomoko)[JP/JP] 〒150-8011 東京都渋谷区神宮前6-26-1
(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 長洲毅志(NAGASU, Takeshi)[JP/JP] 〒300-2635 茨城県つくば市東光台5-1-3			キリムビール株式会社 医薬事業本部内 Tokyo, (JP) 大林正也(OBAYASHI, Masaya)[JP/JP] 〒194-8533 東京都町田市旭町3-6-6
エーディ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki, (JP) 杉田雄二(SUGITA, Yuji)[JP/JP] 押田忠弘(OSHIDA, Tadahiro)[JP/JP] 大林 泉(OBAYASHI, Izumi)[JP/JP] 今井豊穂(IMAI, Yukiho)[JP/JP] 吉田 靖(YOSHIDA, Nei)[JP/JP] 〒216-0001 神奈川県川崎市宮前区野川907 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社 ジェノックス創薬研究所内 Kanagawa, (JP)			協和醸酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo, (JP) 郡司省道(GUNJI, Shigemichi)[JP/JP] 〒140-8710 東京都品川区広町1-2-58 二共株式会社 研究企画部内 Tokyo, (JP) 小川 寛(OGAWA, Kaoru)[JP/JP] 松井慶子(MATSUI, Keiko)[JP/JP] 〒154-0004 東京都世田谷区太子堂3-35-31 国立小児病院 小児医療研究センター内 株式会社 ジェノックス創薬研究所内 Tokyo, (JP)
			(74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)
			(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)
			添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: POLLINOSIS-ASSOCIATED GENE 513

(54) 発明の名称 花粉症関連遺伝子、513

(57) Abstract

A novel gene undergoing significantly low expression in subjects showing high cedar pollen-specific IgE levels. This gene has been successfully isolated by preparing T cells from subjects showing different cedar pollen-specific IgE levels before and after the pollen-scattering season and searching the gene by the differential display method. It is found out that this gene is usable in examining allergic diseases and screening candidate compounds for remedies for allergic diseases.

(57)要約

スギ花粉特異的 IgE 値が異なる複数の被験者から花粉飛散時期前後に T 細胞を調製し、ディファレンシャルディスプレイ法により遺伝子を検索した結果、スギ花粉特異的 IgE 値が高値を示す被験者で有意に発現が高い新規遺伝子を単離することに成功した。本発明者らは、この遺伝子をアレルギー疾患の検査およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニングに使用できることを見出した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルベニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LS レソト	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジ兰ド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴー
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドゥヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG モダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサオ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ヴィエトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジニノヴゴロド	YU ユーゴースラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

- 1 -

明細書

花粉症関連遺伝子、513

技術分野

本発明は、アレルギー疾患、特に花粉症に関する遺伝子、並びに該遺伝子の発現を指標としたアレルギー疾患の検査方法およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法に関する。

背景技術

花粉症を含むアレルギー疾患は多因子性の病気(multifactorial diseases)と考えられている。これらの病気は多くの異なる遺伝子の発現の相互作用によって起こり、これらの個々の遺伝子の発現は、複数の環境要因によって影響を受ける。このため、特定の病気を起こす特定の遺伝子を解明することは、非常に困難である。

またアレルギー疾患は、変異や欠陥を有する遺伝子の発現や、特定の遺伝子の過剰発現や発現量の減少が関わっていると考えられている。病気に関して遺伝子発現が果たしている役割を解明するためには、遺伝子が発症にどのように関わり、薬剤などの外的な刺激が遺伝子発現をどのように変化させるのかを理解する必要がある。

近年の遺伝子発現の解析技術の発達により、多くの臨床試料で、遺伝子の発現を解析・比較することが可能となった。このような方法としては、ディファレンシャルディスプレイ(DD)法が有用である。ディファレンシャルディスプレイ法は、ライアンおよびパディー(Liang and Pardee)によって1992年に最初に開発された(Science, 1992, 257:967-971)。この方法を用いることによって、1回に数十種類以上のサンプルをスクリーニングすることができ、それらのサンプル中で発現

が変化した遺伝子を検出することが可能である。このような方法を用いて、変異が生じた遺伝子や、時間や環境とともに発現が変わるような遺伝子を調べることによって、病因遺伝子の解明のために重要な情報がもたらされることが期待される。これらの遺伝子には、環境要因によって発現に影響を受けるような遺伝子も含まれる。

アレルギー疾患の中でも花粉症は、近年多くの人に見られる疾患の一つである。花粉症の病因には、環境要因の一つである花粉によって発現が影響を受ける複数の遺伝子が関わっていると考えられる。このような事情から、花粉症に関連する遺伝子を単離することが望まれていた。

発明の開示

本発明は、アレルギー疾患、特に花粉症に関連する遺伝子を提供することを課題とする。さらに、本発明は該遺伝子の発現を指標とした、アレルギー疾患の検査方法およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、既に確立された「蛍光 DD(Fluorescent DD)法」(T. Ito ら, 1994, FEBS Lett. 351: 231-236) の手順に基づき、複数のヒトの血液から調製した T 細胞 RNA サンプルを解析できる DD システムを新たに開発した。このシステムを用いて、本発明者らは花粉症患者を含む複数の被験者について、花粉飛散の前後の血液から T 細胞を採取し、スギ花粉特異的 IgE 値の異なる被験者間や花粉飛散前後で発現量が変化する遺伝子のスクリーニングを行い、新規遺伝子（「513」遺伝子）を単離した。

本発明者らは、被験者をスギ花粉に対する IgE 値の高い群（スギ花粉症素因群）とそれ以外の群（健常者）に分け、単離した「513」遺伝子の発現量を両群において比較解析した結果、該遺伝子が健常者と比較してスギ花粉症素因群において有意に高値を示すことを見出した。このため、本発明者らは、該遺伝子の発現量を

指標として、アレルギー疾患の検査およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見出した。

すなわち、本発明は、アレルギー素因を有する者に高い発現を示す遺伝子、および該遺伝子の発現を指標としたアレルギー疾患の検査方法およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法に関する。より具体的には、

- 〔1〕配列番号：1に記載の塩基配列を含む核酸分子、
- 〔2〕配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含む核酸分子、
- 〔3〕〔1〕または〔2〕に記載の核酸分子に特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA、
- 〔4〕〔3〕に記載のDNAを用いることを特徴とする、〔1〕に記載の核酸分子の検出方法、
- 〔5〕アレルギー疾患の検査方法であって、
 - (a) 被験者からT細胞を調製する工程、
 - (b) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、
 - (c) 該RNA試料に対して、標識した〔3〕に記載のDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、
 - (d) 標識した〔3〕に記載のDNAにハイブリダイズする被験者由来のRNA量を測定し、対照（健常者の場合）と比較する工程、を含む方法、
- 〔6〕アレルギー疾患の検査方法であって、
 - (a) 被験者からT細胞を調製する工程、
 - (b) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、
 - (c) 該RNA試料に対して逆転写反応を行いcDNAを合成する工程、
 - (d) 該cDNAを鋳型に、〔3〕に記載のDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行う工程、
 - (e) ポリメラーゼ連鎖反応により増幅されたDNA量を、対照（健常者の場合）と比較する工程、を含む方法、

- 4 -

[7] ポリメラーゼ連鎖反応を PCR 増幅モニター法により行う、[6] に記載の方法、

[8] T 細胞が被験者の末梢血から調製される、[5] から [7] のいずれかに記載の方法、

[9] アレルギー疾患がスギ花粉症である、[5] から [8] のいずれかに記載の方法、

[10] アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 花粉症のモデル動物に被検化合物の投与および花粉抗原による刺激を行う工程、

(b) 該モデル動物から T 細胞を調製する工程、

(c) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、

(d) 該 RNA 試料に対して、標識した [3] に記載の DNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、

(e) 標識した [3] に記載の DNA にハイブリダイズする該 T 細胞由来の RNA 量を測定する工程、

(f) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (e) において測定される RNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

[11] アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 花粉症のモデル動物に被検化合物の投与および花粉抗原による刺激を行う工程、

(b) 該モデル動物から T 細胞を調製する工程、

(c) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、

(d) 該 RNA 試料に対して逆転写反応を行い cDNA を合成する工程、

(e) 該 cDNA を鋳型に、[3] に記載の DNA をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行う工程、

(f) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (e) において増幅

される DNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

[1 2]アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 被検化合物を花粉症のモデル動物に投与する工程、
- (b) 該モデル動物からリンパ球を調製する工程、
- (c) 該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、
- (d) 該抗原刺激を受けたリンパ球から T 細胞を分離する工程、
- (e) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、
- (f) 該 RNA 試料に対して、標識した [3] に記載の DNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、
- (g) 標識した [3] に記載の DNA にハイブリダイズする該 T 細胞由来の RNA 量を測定する工程、

(h) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (g) において測定される RNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

[1 3]アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 被検化合物を花粉症のモデル動物に投与する工程、
- (b) 該モデル動物からリンパ球を調製する工程、
- (c) 該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、
- (d) 該抗原刺激を受けたリンパ球から T 細胞を分離する工程、
- (e) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、
- (f) 該 RNA 試料に対して逆転写反応を行い cDNA を合成する工程、
- (g) 該 cDNA を鋳型に、[3] に記載の DNA をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行う工程、
- (h) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (g) において増幅される DNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

[1 4]アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 花粉症のモデル動物または花粉症を有するヒトからリンパ球を調製する

工程、

- (b) 被検化合物の存在下、該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、
- (c) 該抗原刺激を受けたリンパ球から T 細胞を分離する工程、
- (d) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、
- (e) 該 RNA 試料に対して、標識した [3] に記載の DNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、
- (f) 標識した [3] に記載の DNA にハイブリダイズする該 T 細胞由来の RNA 量を測定する工程、

(g) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (f) において測定される RNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

[1 5]アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 花粉症のモデル動物または花粉症を有するヒトからリンパ球を調製する工程、
- (b) 被検化合物の存在下、該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、
- (c) 該抗原刺激を受けたリンパ球から T 細胞を分離する工程、
- (d) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、
- (e) 該 RNA 試料に対して逆転写反応を行い cDNA を合成する工程、
- (f) 該 cDNA を鑄型に、[3] に記載の DNA をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行う工程、

(g) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (f) において増幅される DNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

[1 6]アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 被検化合物の存在下、株化 T 細胞をリンパ球刺激物質で刺激する工程、
- (b) 該刺激を受けた株化 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、
- (c) 該 RNA 試料に対して、標識した [3] に記載の DNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、

(d) 標識した〔3〕に記載のDNAにハイブリダイズする該株化T細胞由來のRNA量を測定する工程、

(e) 対照(被検化合物非投与の場合)と比較して、工程(d)において測定されるRNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

〔17〕アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検化合物の存在下、株化T細胞をリンパ球刺激物質で刺激する工程、

(b) 該刺激を受けた株化T細胞からRNA試料を調製する工程、

(c) 該RNA試料に対して逆転写反応を行いcDNAを合成する工程、

(d) 該cDNAを鑄型に、〔3〕に記載のDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行う工程、

(e) 対照(被検化合物非投与の場合)と比較して、工程(d)において増幅されるDNA量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

〔18〕T細胞が、花粉症のモデル動物の末梢血から調製される、〔10〕または〔11〕に記載の方法、

〔19〕リンパ球が末梢血から調製される、〔12〕から〔15〕のいずれかに記載の方法、

〔20〕アレルギー疾患がスギ花粉症である、〔10〕から〔19〕のいずれかに記載の方法、に関する。

本発明において、アレルギー疾患(allergic disease)とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。より具体的には、アレルゲンが同定され、アレルゲンへの曝露と病変の発症に深い結びつきが証明され、その病変に免疫学的な機序が証明されることと定義することができる。ここで、免疫学的な機序とは、アレルゲンの刺激によってT細胞が免疫応答を示すことを意味する。代表的なアレルギー疾患には、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、花粉症、あるいは昆虫アレルギー等を示すことができる。アレルギー素因(allergic diathesis)とは、アレルギー疾患を持つ親から子に伝えられる遺伝的な因子である。家族

性に発症するアレルギー疾患はアトピー性疾患とも呼ばれ、その原因となる遺伝的に伝えられる因子がアトピー素因である。

なお、本発明における「核酸分子」には、DNA および RNA が含まれる。また、本発明における「アレルギー疾患の検査」には、アレルギー疾患を発症している患者に対する検査だけでなく、アレルギー疾患を発症していない被験者に対してアレルギー素因を有するか否かを判定するための検査も含まれる。

本発明は、個体のスギ花粉に対する IgE 産生反応に相関する新規な遺伝子「513」に関する。本発明者らにより見出された「513」cDNA の塩基配列を配列番号：1 に示す。

本発明者らにより単離された「513」cDNA の塩基配列は、「513」cDNA の部分配列であるが、当業者においては、配列番号：1 に記載の「513」cDNA の配列情報を基に、「513」の全長 cDNA を単離することは、通常行いうる。即ち、「513」由来の配列をプローブとして T 細胞 cDNA ライブラリーなどをハイブリダイゼーションによってスクリーニングする方法や、「513」由来の配列をプライマーとして用い、T 細胞 cDNA ライブラリーなどの DNA を鋳型として、プライマーに特異的なサイズの増幅産物が得られることを指標としてライブラリーをスクリーニングして cDNA の全長を取得する方法がある。また、「513」由来の配列をプライマーとして用い、T 細胞などの mRNA を一本鎖 cDNA に変換し、末端にオリゴマーを付加してから PCR を行う RACE 法(Frohman, M. A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 8992, 1988) によって「513」の配列を延長する方法がある。

本発明における「配列番号：1 に記載の塩基配列を含む核酸分子」には、このように配列番号：1 に記載の「513」cDNA の配列情報を基に単離しうる、「513」の全長 cDNA が含まれる。

「513」は、アトピー素因群（スギ花粉に対する IgE 値が 3.5 AU/ml 以上）の方がアトピー非素因群よりも有意に高い発現を示した。従って、「513」の遺伝子の発現（mRNA への転写およびタンパク質への翻訳を含む）を指標に、アレルギー疾

患の検査およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であると考えられる。

本発明において検査・治療の対照となるアレルギー疾患としては、特にスギ花粉症が好ましい。

本発明におけるアレルギー疾患の検査における「513」の遺伝子の発現の検出は、「513」遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または本発明の遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術を利用して行うことが可能である。

本発明の検査に用いられるプローブまたはプライマーとしては、「513」遺伝子に特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する核酸分子が用いられる。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、他の遺伝子をコードするDNAおよび／またはRNAとクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを指す。たとえば、Express Hybridization Solution (CLONTECH社製) 中でプローブと転写膜を68°Cでハイブリダイゼーションし、最終的に0.1X SSC, 0.05% SDS溶液にて、50°Cで洗浄することにより、ストリンジエントな条件とすることができる。

これら核酸分子は合成されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブDNAは、通常、標識したものが用いられる。標識としては、例えば、DNAポリメラーゼIを用いるニックトランスレーションによる標識、ポリヌクレオチドキナーゼを用いる末端標識、クレノーフラグメントによるフィルイン末端標識 (Berger SL, Kimmel AR. (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Method in Enzymology, Academic Press; Hames BD, Higgins SJ (1985) Genes Probes: A Practical Approach. IRL Press; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press)、RNAポリメラーゼを用いる転

写による標識 (Melton DA, Krieg PA, Rebagkiati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. (1984) Nucleic Acid Res., 12, 7035-7056)、放射性同位体を用いない修飾ヌクレオチドをDNAに取り込ませる方法 (Kricka LJ. (1992) Nonisotopic DNA Probing Techniques. Academic Press) 等が挙げられる。

ハイブリダイゼーション技術を利用したアレルギー疾患の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットプロット法、DNAマイクロアレイを用いた方法などを使用して行うことができる。

一方、遺伝子増幅技術を利用した方法としては、例えば、RT-PCR法を用いることができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程において実施例8に示すようにPCR増幅モニター法を用いれば、「513」遺伝子の発現のより正確な定量を行うことができる。

PCR遺伝子増幅モニター法においては、両端に互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象 (DNAもしくはRNAの逆転写産物)にハイブリダイズさせる。PCR反応が進んでTaqポリメラーゼの5'-3'エクソヌクレアーゼ(exonuclease)活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定することにより、PCR増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する (Holland, P.M. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:72 76-7280; Livak, K. J. et al., 1995, PCR Methods and Applications 4(6):357-362; Heid, C. A. et al., Genome Research 6:986-994; Gibson, E. M. U. et al., 1996, Genome Research 6:995-1001)。PCR増幅モニター法においては、例えば、ABI PRISM7700(パーキンエルマー社)を用いることができる。

また、本発明のアレルギー疾患の検査は、「513」によりコードされるタンパク質を検出することにより行うことも考えられる。このような検査方法としては、例えば、「513」によりコードされるタンパク質に結合する抗体を利用したウェス

タンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA 法などを利用することができる。

本発明の「513」によりコードされるタンパク質の抗体は、当業者に周知の技法を用いて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体として得ることができる (Milstein C, et al., 1983, Nature 305(5934): 537-40)。抗原に用いるタンパク質もしくはその部分ペプチドは、例えば「513」遺伝子もしくはその一部を発現ベクターに組込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換えタンパク質を発現させ、発現させた組み換えタンパク質を培養体または培養上清から精製することにより得ることができる。

本発明におけるアレルギー疾患の検査の結果、本発明の遺伝子の発現が有意に高ければ、被験者は例えばスギ花粉抗原のようなアレルゲンに対する IgE 値が高く、アレルギー素因を有すると判定することができる。アレルゲン特異的抗体価や、症状などと併せて、本発明の遺伝子の発現レベルの測定を、アレルギー疾患の検査に用いることが可能である。

T 細胞に発現する「513」遺伝子は花粉抗原に対する特異的 IgE の高い、花粉症患者群において発現が増大している。スギ花粉以外の抗原に対する応答性を示すアレルギー患者においても、当該抗原に対する T 細胞の応答性の亢進している状態で「513」遺伝子の発現が増大する可能性がある。このようなケースでは「513」遺伝子の発現増大が T 細胞の応答性の亢進に対応しており、従って「513」遺伝子の発現をモニターすることによってアレルギー疾患治療薬のスクリーニングを行うことができる。

本発明のアレルギー疾患治療候補化合物のスクリーニング方法は、*in vivo* で行なうことも *in vitro* で行なうこともできる。*in vivo* でのスクリーニングにおいては、例えば、マウス等のモデル動物に、候補薬剤の投与および花粉抗原での刺激を行った後、末梢血より T 細胞を分離し、「513」の転写産物を測定する。あるいは、マウス等のモデル動物に候補薬剤を投与した後、末梢血よりリンパ球を分離し、該リンパ球をスギ花粉抗原等で *in vitro* で刺激する。該刺激後のリンバ

球から T 細胞を分離し、その「513」遺伝子の転写産物を測定する。これら測定の結果、「513」遺伝子の転写量を低下させる化合物を選択する。ここで花粉抗原による刺激は、T 細胞において抗原特異的なアレルギー反応を惹起し、それに対する候補化合物の治療効果を判定することを目的として行うものである。

また、*in vitro* でのスクリーニングにおいては、例えば、花粉症のヒトまたはマウス等から末梢血リンパ球を採取し、スギ花粉抗原で、該末梢血リンパ球を *in vitro* で刺激する。*in vitro* 刺激の際に候補化合物を添加する。その後、刺激された末梢血リンパ球から T 細胞を分離し、「513」の転写産物を測定する。この測定の結果、「513」遺伝子の転写量を低下させる化合物を選択する。

また、本発明のアレルギー疾患治療候補化合物のスクリーニングは、株化 T 細胞を用いて行なうこともできる。例えば、Molt4 細胞、Jurkat 細胞などの株化 T 細胞をリンパ球刺激物質で *in vitro* で刺激する。リンパ球刺激物質としては、例えば、カルシウムイオノフォア (A23187)、PMA、フィトヘマグルチニン (PHA) などが挙げられる。*in vitro* 刺激の際に候補薬剤を添加する。その後、該株化 T 細胞における「513」遺伝子の転写量を測定する。この測定の結果、「513」遺伝子の転写を低下させる化合物を選択する。

アレルギー疾患治療候補化合物のスクリーニングにおける「513」の遺伝子の発現の検出は、本発明のアレルギー疾患の検査と同様、「513」遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または本発明の遺伝子にハイブリダイズする DNA をプライマーとした遺伝子増幅技術を利用して行なうことが可能である。

ハイブリダイゼーション技術を利用した方法としては、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットプロット法、DNA マイクロアレイを用いた方法などを使用して行なうことができる。一方、遺伝子増幅技術を利用した方法としては、RT-PCR 法を用いることができる。RT-PCR 法においては、遺伝子の増幅過程において実施例 8 に示すような PCR 増幅モニター法を用いれば、「513」遺伝子の発現の

より正確な定量を行うことができる。

これらスクリーニングに用いる被検化合物としては、ステロイド誘導体等既存の化学的方法により合成された化合物標品、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物標品のほか、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、またそれから精製された標品などが挙げられる。

本発明のアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法により単離される化合物は、花粉抗原等のアレルゲンに対するアレルギー素因を改善する薬剤の候補になる。

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を、医薬品として用いる場合には、公知の製剤学的製造法により製剤化して用いることが可能である。例えば、薬理学上許容される担体または媒体（生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤など）とともに患者に投与される。投与は、化合物の性質に応じて、経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、静脈内、または経口的に行われる。投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することが可能である。

図面の簡単な説明

図1は、血液を採取した被験者10人、計18の血液試料におけるスギ花粉特異的IgE抗体の抗体価を表す図である。被験者A～J（試料番号1～18）の各血液試料のスギ花粉特異的IgE抗体の値をAU/mlで表した。花粉飛散前を左（白いカラム）、飛散後を右（黒いカラム）に対し表した。被験者AおよびBは、花粉飛散後の血液のみ採取した。

図2は、スギ花粉特異的IgE値によって群分けした場合の高IgE群および正常IgE群における「513」の発現変化を示す図である。エラーバーは標準偏差を表す。

発明を実施するための最良の形態

- 14 -

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例 1] 10 人の成人ボランティアからの血液採取

花粉飛散前後の T 細胞を採取するため、成人ボランティア 10 名 (A～J) から 10 ml の血液サンプルを、花粉飛散前および花粉飛散後に採取した。最初の血液サンプルは、日本のスギ花粉飛散の季節の前 (1997 年 1 月および 2 月) に採取し、2 回目は日本のスギ花粉飛散後 (1997 年 3、4 および 5 月) に採取した。ボランティアのうち 8 人については、2 つの時期のサンプルを得た。残る 2 名のボランティアに関しては、花粉飛散後のサンプルのみ入手できた。これらの血液サンプルの一部を用いて、スギ花粉特異的 IgE の量を測定した。特異的 IgE の測定はペーパーディスクを固相とする RAST 法 (radio allergo sorbent test, Wide, L. et, al.: Lancet 2: 1105-1107, 1967) を改良した CAP RAST 法 (Pharmacia 社) により行った。Pharmacia 社製の標準の抗体価を含む血清を用いて、それを基準にしてそれぞれの検体の IgE 抗体価（単位は Pharmacia RAST Unit, PRU、あるいは AU (arbitrary unit) とも表示する）を決定した。

測定された各被験者における花粉飛散前後でのスギ花粉特異的 IgE 値を図 1 に示す。図に示されるように、10 人の被験者の大半で、花粉被曝後にスギ花粉特異的 IgE の血清中の濃度が増加した。アトピー素因を有するかどうかは、スギ花粉特異的 IgE の CAP RAST 試験の値が 2 より大きいかどうかで判断した。すなわち、被験者 A～G および I の 8 人の被験者をアトピー素因群（以後「患者」とも記す）、被験者 H、J の 2 人を健常者（以後「正常群」とも記す）とした。8 人のアトピー素因を有する被験者のうち 7 人が、花粉飛散後にアレルギー性鼻炎の症状を示した。

[実施例 2] 血液試料からのリンパ球画分の調製

血液 10 ml から T 細胞を調製する場合は、以下のようにした。まずノボ社製等のヘパリン 1 ml で注射筒壁を万遍なく処理し、最終濃度 50 unit/ml のヘパリン

を含む 10 ml 注射筒に採血した。このとき一人の採血に 22G 針を 2 本準備した。注射針をはずし、50 ml の遠心チューブ（ポリプロピレン製）に移した。1500 rpm、室温で 5 分間遠心し、できるだけ表面近くから 1.1 ml を採取し、15000 rpm で 5 分間、4°C で遠心して上清 1 ml を血漿（plasma）として回収した。血漿を回収した残りに 3% のデキストラン（ナカラライ社製）を含む 0.9% NaCl を等量（9 ml）加え、静かに数回転倒させて混和した。その後 30 分間室温で静置した。PRP（Platelet rich plasma、血小板に富む血漿）を別の 15 ml 遠心チューブに移し、1200 rpm（トミー社製の遠心機で 150×g に相当する）で 5 分間、室温で遠心した。遠心後、血小板は上清にあった。沈殿した細胞をギブコ社等から入手した Ca、Mg 不含の HBSS 5 ml に懸濁した。これを、バスツールピペットを用いて Ficol Paque（ファルマシア社製）が 5 ml が入ったチューブ（ファルコンチューブ：2006 または 2059；ポリプロピレン製）1 本に上層した。1200 rpm で 5 分間遠心後、1500 rpm（Tomy 社製の遠心機で 400×g に相当する）で 30 分間室温で遠心した。その結果、顆粒細胞（granulocyte）、赤血球（erythrocyte）が沈殿し、フィコール層を挟んで中間層にリンパ球（lymphocyte）、単球（monocyte）、血小板（platelet）が含まれた。

バスツールピペットで中間層を回収し、2~3 倍の容量の BSA/PBS（0.5% BSA、2 mM EDTA in PBS、pH7.2；使用直前に脱気した）を添加し、1200 rpm、4°C で 5 分間遠心した。沈殿を回収し、BSA/PBS で 2 回洗浄した。2 回目の洗浄後、細胞を 5 ml に懸濁し、その一部をトリパンブルーで 2 倍に希釈して細胞数を測定した。全細胞数は約 1×10^7 であった。これをリンパ球画分とした。

[実施例 3] リンパ球画分からの T 細胞の分離

実施例 2 で得たリンパ球画分を 1200 rpm で 4°C、5 分間遠心し、 $100 \mu\text{l}$ あたり 10^8 になるように BSA/PBS に懸濁した。容量は約 $20 \mu\text{l}$ になった。これをエッペンドルフチューブ（1.5 ml）に移し、CD3 マイクロビーズ液を添加した。その後、30 分間 4~10°C に放置した（このとき水上には置かなかった）。この試料をマグネ

チックセルソーター(MACS) (Miltenyi Biotech Inc. 製) で以下のように処理した。

MS⁺/RS⁺カラムを Mini MACS または Vario MACS セパレーションユニットに装着した(針は付けなかった)。500 μl の BSA/PBS をカラムに静かにアプライし、バッファーは流し出した。次に CD3 マイクロビーズ標識した細胞をカラムにアプライした。カラムを 500 μl で 3 回洗浄した(B 細胞画分)。カラムをセパレーションユニットからはずし、溶出液を集めるチューブ上に置いた。1 ml の BSA/PBS をカラムにアプライし、カラム添付のプランジャーを用いポジティブ細胞を急速に流し出した。これを T 細胞画分とした。

得られた T 細胞画分について、1200 rpm、5 分間 4℃で遠心した。沈殿を BSA/PBS で 2 回洗浄した。2 回目の洗浄後、細胞を 1 ml に懸濁し、その一部をトリバンブルーで 2 倍に希釈して細胞数を測定した。全細胞数は約 4×10^6 であった。

[実施例 4] T 細胞からの全 RNA の調製

T 細胞からの全 RNA の調製は RNeasy Mini (Qiagen 製) を用い、原則として添付のマニュアルに従い行った。操作はすべて手袋を着用して、室温で行った。またウォッシュバッファー RPE に 4 倍量のエタノールを加えた。リシスバッファー RLT には 10 μl/ml の 2-メルカプトエタノールを加えた。細胞浮遊液を 1000~1200 rpm で 5 分間遠心し、上清をアスピレーションで除いた。沈殿に 350 μl のリシスバッファー RLT(2-メルカプトエタノールを含む) 溶液を加えた。この段階で、RLT バッファー中の細胞のライセートは、-70℃で保存可能であった。細胞のライセートを冷凍保存していた場合は、37℃で 10~15 分間インキュベートして、不溶物が見えるようなら最大速度で 3 分間遠心し、上清のみを回収した。このライセートを 20G のカテラン針を付けた注射筒でホモゲナיז後、キアシュレッダー (QIAshredder) で処理した。(即ち、通常 350 μl の細胞のライセートをキアシュレッダーユニットにピペットマンを用いてアプライした。これを 1500 rpm で 2 分間遠心し、流出液を回収した。) 350 μl の 70% エタノールを加え、ピペッティングしてよく混ぜた。RNeasy スピンカラムを添付の 2 ml チューブに装着し、細胞のラ

- 17 -

イセート混合物をアプライし、 $8000 \times g$ (11500 rpm)で1分間遠心し、流出液は捨てた。ウォッシュバッファーRW1 700 μl をカラムにアプライし、5分間フタをした形で立てた。11500 rpmで15秒間遠心し、流出液は捨てた。カラムを新しい2 ml チューブに装着し、ウォッシュバッファーRPE(エタノールを含む) 500 μl をカラムにアプライした後、11500 rpmで15秒間遠心し、流出液は捨てた。ウォッシュバッファーRPE 500 μl をカラムにアプライし、最大速度で2分間遠心した。カラムを新しい1.5 ml チューブに装着し、DEPC処理した水 30 μl をアプライし、フタをして10分間立てた。11500 rpmで10分間遠心し、全RNAを得た。濃度を測定し、量が少ないようなら、再度カラムを新しい1.5 ml チューブに装着し、DEPC処理した水 30 μl をアプライし、フタをして10分間立て、11500 rpmで10分間遠心した。

[実施例5] 全RNAのDNase処理

T細胞から調製した全RNAからDNAを除去するため、DNase処理を行った。反応は2ユニットのDNase(ニッポンジーン社)および50ユニットのRNaseインヒビター(ファルマシア社)を含む100 μl の1×DNaseバッファー(ニッポンジーン社)中で行った。これを37°C15分間インキュベートした後、等量のPCI(フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25:24:1)を加え、ボルテックスした。12000 rpmで室温、10分間遠心し、上層(水層)を新しい1.5 ml チューブに移した。1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加え、2.5倍量の100%エタノールおよびエタ沈メイト1 μl を加えて、転倒混和させた。-20°Cで15分間静置させた後、2000 rpmで4°C、15分間遠心し、上清を除去し、70%エタノールを加えた。沈殿がはがれる程度にタッピングした後、上清をきれいに除去した。3分間乾燥させ、10~20 μl のDDW(DNaseおよびRNase不含)に溶解させた。濃度を測定し、使用まで-80°Cに保存した。

[実施例6] T細胞から調製した全RNAを用いたディファレンシャルディスプレイ(DD)解析

T細胞から調製した全 RNA を用いた蛍光ディファレンシャルディスプレイ (Fluorescent Differential Display, 「DD」と略記する) 解析は文献 (T. Ito ら, 1994, FEBS Lett. 351: 231-236) に記載の方法に準じて行った。T細胞から調製した全 RNA を逆転写し、cDNAを得た。第一次 DD-PCR 反応用には3種のアンカープライマーの各々について全 RNA の各 $0.2 \mu\text{g}$ を用いて cDNA を調製した。第二次 DD-PCR 反応用には、3種のアンカープライマーの各々について RNA $0.4 \mu\text{g}$ を用いて cDNA を調製した。いずれの cDNA も、 $0.4\text{ng}/\mu\text{l}$ RNA 相当の最終濃度に希釈し、実験に用いた。1反応あたり 1 ng RNA 相当の cDNA を用いて DD-PCR 反応を行った。反応液の組成は表 1 の通りである。

表 1

cDNA ($0.4\text{ng}/\mu\text{l}$ RNA 相当)	$2.5 \mu\text{l}$
任意プライマー ($2 \mu\text{M}$)	$2.5 \mu\text{l}$
$10\times$ AmpliTaq PCR バッファー	$1.0 \mu\text{l}$
2.5mM dNTP	$0.8 \mu\text{l}$
$50 \mu\text{M}$ アンカープライマー (GT15A, GT15C, GT15G)	$0.1 \mu\text{l}$
Gene Taq ($5\text{U}/\mu\text{l}$)	$0.05 \mu\text{l}$
AmpliTaq ($5\text{U}/\mu\text{l}$)	$0.05 \mu\text{l}$
dH ₂ O	$3.0 \mu\text{l}$
総量	$10.0 \mu\text{l}$

PCR の反応条件は、「 $95^\circ\text{C} 3$ 分、 $40^\circ\text{C} 5$ 分、 $72^\circ\text{C} 5$ 分」を 1 サイクル、続いて、「 $94^\circ\text{C} 15$ 秒、 $40^\circ\text{C} 2$ 分、 $72^\circ\text{C} 1$ 分」を 30 サイクルの後、 $72^\circ\text{C} 5$ 分、その後連続的に 4°C にした。

使用したプライマー対はアンカープライマーである GT15A (配列番号 : 2)、GT15C (配列番号 : 3)、および GT15G (配列番号 : 4) に対して任意プライマーをそれぞれ AG 1~110、AG 111~199、および AG 200~287 を組み合わせ、計 287 組の反応をおこなった。なお、任意プライマーとしては GC 含量 50% の 10 ヌクレオチドからなるオリゴマーを設計し、合成して用いた。

ゲル電気泳動は、6% 変性ポリアクリルアミドゲルを作製し、 $2.5 \mu\text{l}$ の試料をアプライし、40W で 210 分間泳動した。その後、日立製蛍光イメージアナライザー FMBI0 II を用いてゲル板をスキャンし、蛍光検出によって泳動画像を得た。

〔実施例 7〕 DD 解析で切り出したバンドの増幅と配列決定

多数の任意プライマーを用いて 2 回の DD 解析を行った。花粉飛散前後または患者と健常者のグループの間で差のあるバンドを選択し、2 回の実験で再現性のあるバンドをゲルから切り出した。

切り出したバンドの 1 つ (「513」と称する) についてさらに解析を進めた。「513」のバンドはアンカープライマーとして GT15C (配列番号 : 3) を、任意プライマーとして AG136 (TCATGCAGAC／配列番号 : 5) を用いた DD 解析によって見出された。

「513」の塩基配列を決定するために、「513」のバンドを含むゲルを切り出し、TE 液に保存し 60°C、10 分加温して DNA をゲルから溶出させた。この TE 液を鋳型として DD-PCR と同条件で PCR を行い、約 360bp の DNA 断片を増幅した。アンカープライマーとして、GT15C を、任意プライマーとして AG136 を用いた。増幅した DNA 断片をプラスミドベクター pCR2.1 (Invitrogen 社) にてクローニングし、約 360bp の DNA 断片を保持するプラスミド p513-122 を得た。プラスミド DNA を用いて常法に従い DNA 断片の塩基配列を決定した。

〔実施例 8〕 ABI-7700 による定量

ABI-PRISM7700 を用いた TaqMan 法により、「513」の発現量の定量を行った。この方法は PCR 増幅された DNA 鎮を蛍光色素を用いてリアルタイムに定量検出する

- 20 -

システムである。

定量のために新たに 1998 年春にスギ花粉飛散前・後の血液試料を 22 名のボランティアから採取し、T 細胞を調製して全 RNA を抽出した。計 44 種の全 RNA 試料を用いて目的の遺伝子の発現量を定量した。

実施例 1 と同様にしてスギ花粉、ヒノキ花粉、ヤケヒヨウダニ、およびコナヒヨウダニの特異的 IgE 値、並びに総 IgE 値を測定した（表 2）。

- 21 -

表 2

特異的 IgE 値

被験者	血液採取時期	特異的 IgE (UA/ml)				総 IgE (UA/ml)
		スギ	ヒノキ	ヤケヒヨウヒダニ	コナヒヨウヒダニ	
A	飛散前	42.7	5.46	1.09	<0.34	300
	飛散後	83.2	7.85	1.28	<0.34	460
B	飛散前	31.9	4.33	72.5	52.6	770
	飛散後	36.8	3.56	78.8	47.9	840
C	飛散前	15.2	1.5	68.7	66.1	450
	飛散後	20.3	1.32	64.3	49.7	330
D	飛散前	13.9	1.11	39.3	63.4	200
	飛散後	18.4	0.81	31.9	54.7	120
E	飛散前	5.25	0.48	<0.34	<0.34	30
	飛散後	8.33	0.46	<0.34	<0.34	38
F	飛散前	6.64	0.39	<0.34	<0.34	26
	飛散後	8.21	0.47	<0.34	<0.34	27
G	飛散前	1.29	<0.34	<0.34	<0.34	26
	飛散後	4.02	<0.34	<0.34	<0.34	30
H	飛散前	1.99	0.41	26.5	36.1	220
	飛散後	3.65	0.53	23.2	29.5	150
I	飛散前	0.93	<0.34	54.6	51.7	130
	飛散後	3.51	<0.34	43.3	39.9	100
J	飛散前	3.55	0.68	0.55	<0.34	96
	飛散後	2.77	0.42	0.39	<0.34	78
K	飛散前	1.2	<0.34	<0.34	<0.34	96
	飛散後	2.72	<0.34	<0.34	<0.34	110
L	飛散前	0.95	0.39	1.3	1.8	13
	飛散後	2.5	0.51	1.45	2.38	18
M	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	36
	飛散後	2.08	<0.34	<0.34	<0.34	43
N	飛散前	0.42	<0.34	<0.34	<0.34	22
	飛散後	1.67	<0.34	0.45	<0.34	73
O	飛散前	0.54	<0.34	28.1	27.2	180
	飛散後	1.42	<0.34	27.2	26.3	160
P	飛散前	0.38	<0.34	5.08	3.65	280
	飛散後	0.68	<0.34	4.49	3.02	240
Q	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	<5.0
	飛散後	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	<5.0
R	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	53
	飛散後	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	62
S	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	420
	飛散後	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	370
T	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	82
	飛散後	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	62
U	飛散前	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	18
	飛散後	<0.34	<0.34	<0.34	<0.34	16
V	飛散前	<0.34	<0.34	0.79	0.81	180
	飛散後	<0.34	<0.34	0.78	0.9	160

実施例 7において決定した DD バンドの塩基配列を基にしてプライマー 513-TQ1 (GCAGACAGTCGATGCTTTCC／配列番号：6)、513-TQ2 (TTTTCTTATGAGGT CCTGCCTT G／配列番号：7)、および TaqMan プローブ 513-TQM (AGGGCAGTTGCATCCTAAAGGT TGTAAAGG／配列番号：8) を設計、合成し定量反応に用いた。TaqMan プローブ 513-TQM は 5' 端を FAM(6-carboxyfluorescein)で、3' 端を TAMRA(6-carboxy-tert-butyl-rhodamine)で蛍光標識して用いた。鑄型には 44 種の全 RNA からポリ T (12~18 マー)をプライマーとして逆転写した cDNA を用いた。コピー数を算出する標準曲線のために実施例 7 で得たプラスミド p513-122 の段階希釈液を鑄型として反応を行った。PCR 増幅のモニタリングのための反応液の組成は表 3 に示した。また、試料中の cDNA 濃度の差を補正するため、 β -アクチン (β -actin) 遺伝子について同様の定量解析を行い、それら遺伝子のコピー数を基に補正して、目的遺伝子 (513) のコピー数を算出した。

- 23 -

表 3

ABI-PRISM 7700 の反応組成（1 ウェルあたりの反応量）

滅菌蒸留水	25.66 (μ L)
10x TaqMan バッファーA	5
25mM MgCl ₂	7
dATP (10mM)	1.2
dCTP (10mM)	1.2
dGTP (10mM)	1.2
dUTP (10mM)	1.2
Forward Primer (100 μ M)	0.15
Reverse Primer (100 μ M)	0.15
513 TaqMan プローブ (6.7 μ M)	1.49
AmpliTaq Gold (5U/ μ L)	0.25
AmpErase UNG (1U/ μ L)	0.5
テンプレート溶液	5
総量	50

β -アクチンのコピー数で補正した各試料中の「513」の存在数（コピー数）を表4に示す。補正は全試料における β -アクチンの平均コピーを求め、それを1としたときの各試料中の β -アクチンの相対値で各試料中の「513」のコピー数を除した。

- 24 -

表4

ABI7700による定量値 (copy/ngRNA)
beta_actin 準正data

被験者	血液採取時期	バンドID
		513
A	飛散前	661
	飛散後	871
B	飛散前	2880
	飛散後	640
C	飛散前	530
	飛散後	403
D	飛散前	1273
	飛散後	433
E	飛散前	636
	飛散後	692
F	飛散前	665
	飛散後	1391
G	飛散前	692
	飛散後	350
H	飛散前	1137
	飛散後	361
I	飛散前	1169
	飛散後	1717
J	飛散前	1846
	飛散後	891
K	飛散前	443
	飛散後	1007
L	飛散前	1742
	飛散後	539
M	飛散前	721
	飛散後	440
N	飛散前	459
	飛散後	342
O	飛散前	662
	飛散後	455
P	飛散前	409
	飛散後	472
Q	飛散前	542
	飛散後	662
R	飛散前	422
	飛散後	25
S	飛散前	435
	飛散後	332
T	飛散前	610
	飛散後	449
U	飛散前	687
	飛散後	455
V	飛散前	679
	飛散後	368

この値を用いて二元配置分散分析を行った。群分けは、スギ花粉飛散前と後、または血清中の各特異的 IgE について 2 回の測定のうち 1 回でも 3.5 AU/ml 以上を示した群（高 IgE グループ）とそれ以外の群（正常 IgE グループ）の 2 つの要因にわけて検定した。各グループの人数は、たとえばスギ花粉の場合、高 IgE グループ 10 人：正常 IgE グループ 12 人であった。また、総 IgE について 200 AU/ml を示した群とそれ以外の群に分けて検定した。二元配置分散分析の検定は StatView ソフトウェア (Abacus Concepts, Inc.) を用いて行った。

その結果、スギ花粉に対する IgE 値で群分けすると、「513」の発現は高 IgE グループにおいて正常 IgE グループよりも有意に高いことが示された（表 5、図 2）。飛散前後のデータを合わせた場合の高 IgE グループおよび正常 IgE グループにおける 513 の発現量はそれぞれ 961.8 ± 626.1 および 556.7 ± 311.8 コピー/ng RNA (平均土標準偏差) であった。

表 5

513

分類		二元配置分散分析 P 値		
		IgE 高/低	飛散前/飛散後	2 因子の相互作用
特異的 IgE	スギ	0.0100	0.0663	0.5189
	ヒノキ	0.0408	0.0518	0.0907
	ヤケヒヨウヒダニ	0.2043	0.0606	0.2496
	コナヒヨウヒダニ	0.2043	0.0606	0.2496
	総 IgE	0.7893	0.0582	0.1872
t 検定				0.0622

[実施例 9] 「513」のクローニングと塩基配列の解析

Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用いて「513」のクローニングを行った。YY-1 細胞株の mRNA を用いて Marathon 用 cDNA を作製し、鑄型として用いた。DD により単離された「513」の塩基配列に基づいて作製した特異的プライマー 513_154L (GCTTGTCCCTGGGGTTCACACTT／配列番号：9) とキットに添付のアダプタープライマーを用いて PCR 反応を行った結果、約 1.1 kb までの增幅産物が得られた。塩基配列を決定したところ、これまでに決定した配列を含む 1171 bp

- 26 -

の配列が得られた。この配列を配列番号：1に示す。

産業上の利用の可能性

本発明により、スギ花粉特異的 IgE 値と相関を示す新規遺伝子が提供された。本発明の遺伝子の発現を指標に、アレルギー素因を有するか否かの検査、およびアレルギー疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能となった。

請求の範囲

1. 配列番号：1に記載の塩基配列を含む核酸分子。
2. 配列番号：1に記載の塩基配列のコード領域を含む核酸分子。
3. 請求項1または2に記載の核酸分子に特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA。
4. 請求項3に記載のDNAを用いることを特徴とする、請求項1に記載の核酸分子の検出方法。
5. アレルギー疾患の検査方法であって、
 - (a) 被験者からT細胞を調製する工程、
 - (b) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、
 - (c) 該RNA試料に対して、標識した請求項3に記載のDNAをプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、
 - (d) 標識した請求項3に記載のDNAにハイブリダイズする被験者由来のRNA量を測定し、対照（健常者の場合）と比較する工程、を含む方法。
6. アレルギー疾患の検査方法であって、
 - (a) 被験者からT細胞を調製する工程、
 - (b) 該T細胞からRNA試料を調製する工程、
 - (c) 該RNA試料に対して逆転写反応を行いcDNAを合成する工程、
 - (d) 該cDNAを鑄型に、請求項3に記載のDNAをプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行う工程、
 - (e) ポリメラーゼ連鎖反応により増幅されたDNA量を、対照（健常者の場合）と比較する工程、を含む方法。
7. ポリメラーゼ連鎖反応をPCR増幅モニター法により行う、請求項6に記載の方法。
8. T細胞が被験者の末梢血から調製される、請求項5から7のいずれかに記載の方法。

9. アレルギー疾患がスギ花粉症である、請求項 5 から 8 のいずれかに記載の方法。

10. アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 花粉症のモデル動物に被検化合物の投与および花粉抗原による刺激を行う工程、

(b) 該モデル動物から T 細胞を調製する工程、

(c) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、

(d) 該 RNA 試料に対して、標識した請求項 3 に記載の DNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、

(e) 標識した請求項 3 に記載の DNA にハイブリダイズする該 T 細胞由来の RNA 量を測定する工程、

(f) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (e) において測定される RNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

11. アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 花粉症のモデル動物に被検化合物の投与および花粉抗原による刺激を行う工程、

(b) 該モデル動物から T 細胞を調製する工程、

(c) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、

(d) 該 RNA 試料に対して逆転写反応を行い cDNA を合成する工程、

(e) 該 cDNA を鋳型に、請求項 3 に記載の DNA をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行う工程、

(f) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (e) において増幅される DNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

12. アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検化合物を花粉症のモデル動物に投与する工程、

(b) 該モデル動物からリンパ球を調製する工程、

- (c) 該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、
- (d) 該抗原刺激を受けたリンパ球から T 細胞を分離する工程、
- (e) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、
- (f) 該 RNA 試料に対して、標識した請求項 3 に記載の DNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、
- (g) 標識した請求項 3 に記載の DNA にハイブリダイズする該 T 細胞由来の RNA 量を測定する工程、
- (h) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (g) において測定される RNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

1 3. アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 被検化合物を花粉症のモデル動物に投与する工程、
- (b) 該モデル動物からリンパ球を調製する工程、
- (c) 該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、
- (d) 該抗原刺激を受けたリンパ球から T 細胞を分離する工程、
- (e) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、
- (f) 該 RNA 試料に対して逆転写反応を行い cDNA を合成する工程、
- (g) 該 cDNA を鑄型に、請求項 3 に記載の DNA をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行う工程、
- (h) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (g) において増幅される DNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

1 4. アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 花粉症のモデル動物または花粉症を有するヒトからリンパ球を調製する工程、
- (b) 被検化合物の存在下、該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、
- (c) 該抗原刺激を受けたリンパ球から T 細胞を分離する工程、
- (d) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、

- 30 -

(e) 該 RNA 試料に対して、標識した請求項 3 に記載の DNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、

(f) 標識した請求項 3 に記載の DNA にハイブリダイズする該 T 細胞由来の RNA 量を測定する工程、

(g) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (f) において測定される RNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

15. アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であつて、

(a) 花粉症のモデル動物または花粉症を有するヒトからリンパ球を調製する工程、

(b) 被検化合物の存在下、該リンパ球を花粉抗原で刺激する工程、

(c) 該抗原刺激を受けたリンパ球から T 細胞を分離する工程、

(d) 該 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、

(e) 該 RNA 試料に対して逆転写反応を行い cDNA を合成する工程、

(f) 該 cDNA を鑄型に、請求項 3 に記載の DNA をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行う工程、

(g) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (f) において増幅される DNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

16. アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であつて、

(a) 被検化合物の存在下、株化 T 細胞をリンパ球刺激物質で刺激する工程、

(b) 該刺激を受けた株化 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、

(c) 該 RNA 試料に対して、標識した請求項 3 に記載の DNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行う工程、

(d) 標識した請求項 3 に記載の DNA にハイブリダイズする該株化 T 細胞由来の RNA 量を測定する工程、

(e) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (d) において測定される RNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

17. アレルギー疾患の治療薬候補化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 被検化合物の存在下、株化 T 細胞をリンパ球刺激物質で刺激する工程、
- (b) 該刺激を受けた株化 T 細胞から RNA 試料を調製する工程、
- (c) 該 RNA 試料に対して逆転写反応を行い cDNA を合成する工程、
- (d) 該 cDNA を鋳型に、請求項 3 に記載の DNA をプライマーとして、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行う工程、
- (e) 対照（被検化合物非投与の場合）と比較して、工程 (d) において増幅される DNA 量を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

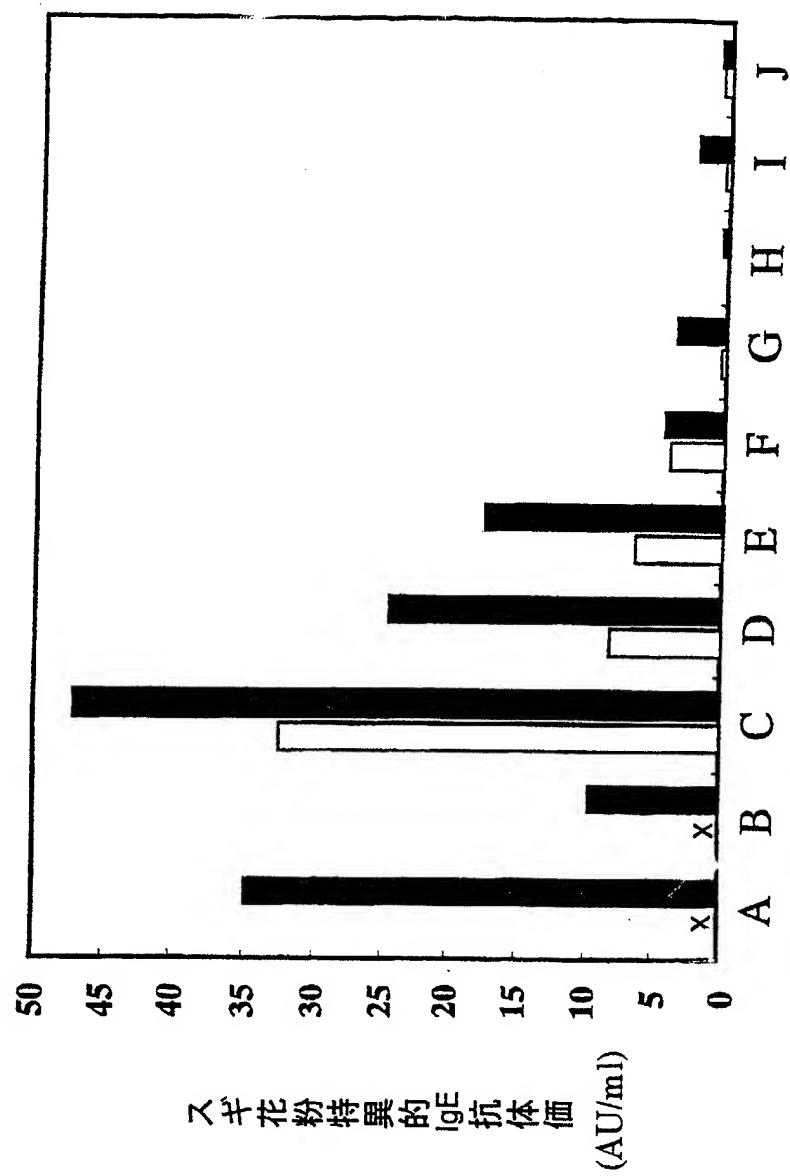
18. T 細胞が、花粉症のモデル動物の末梢血から調製される、請求項 10 または 11 に記載の方法。

19. リンパ球が末梢血から調製される、請求項 12 から 15 のいずれかに記載の方法。

20. アレルギー疾患がスギ花粉症である、請求項 10 から 19 のいずれかに記載の方法。

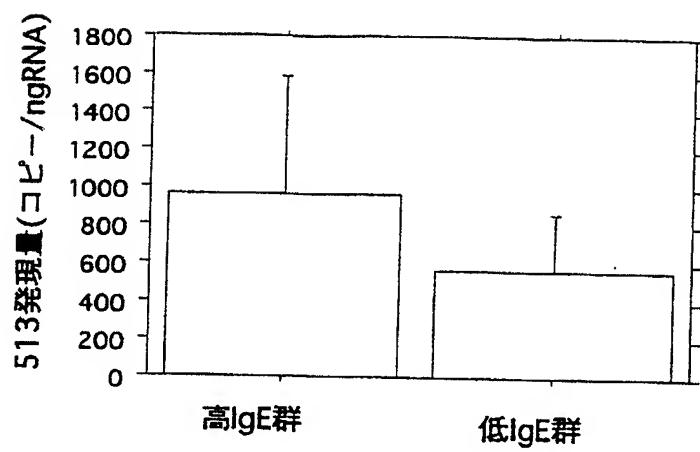
1 / 2

図 1



2 / 2

図 2



1/6

SEQUENCE LISTING

<110> Genox Research, Inc.

<120> "513", A NOVEL GENE RELATED TO POLLEN ALLERGY

<130> G1-103PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-120491

<151> 1999-04-27

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

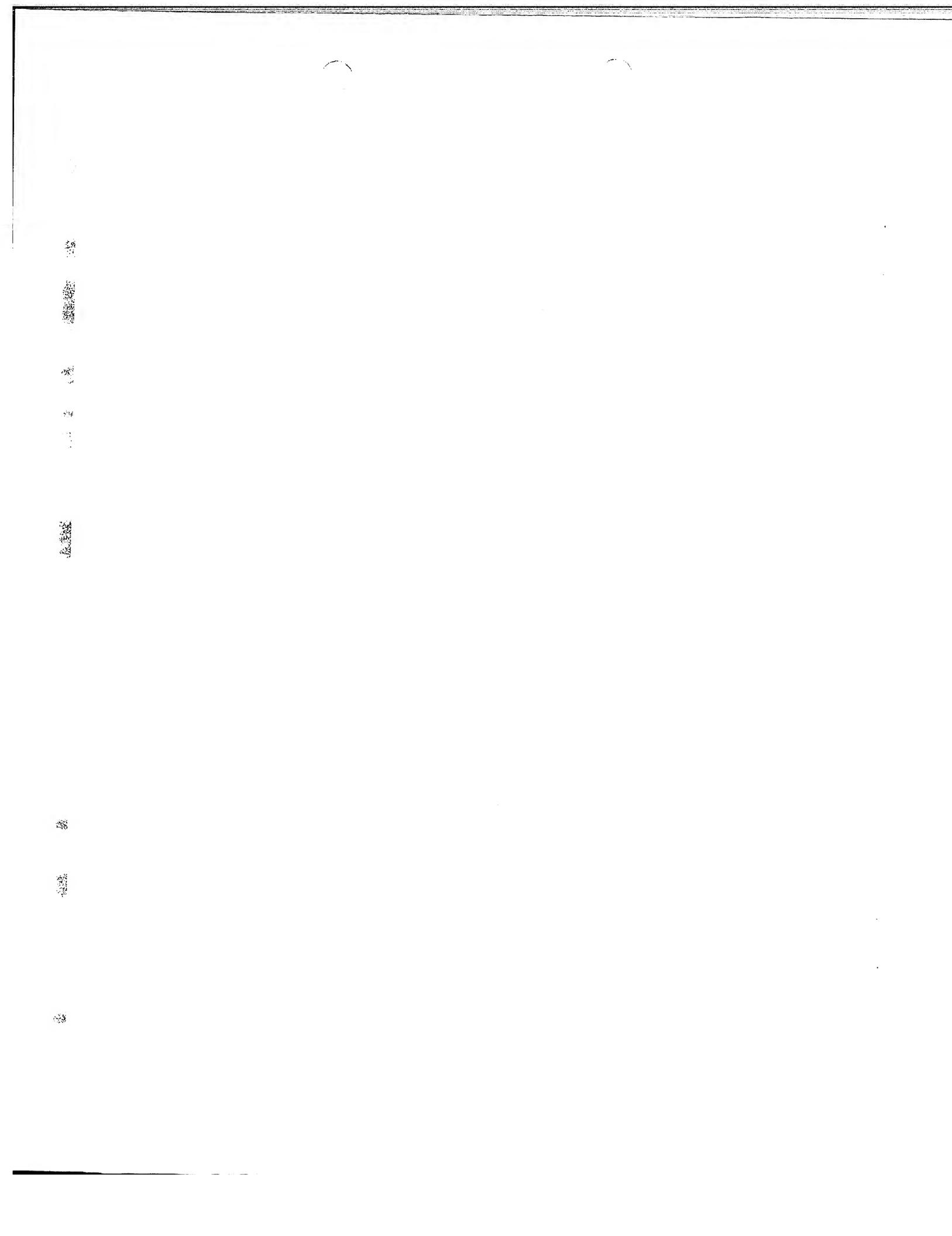
<211> 1171

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> !

actcactata gggctcgagc ggccgcgggg caggtataacc ttccgggttt ttgagaatct 60



2/6

gagaatgatg gaggagaaaat ggaaagatag gaatagaaaag agattacatt aggaattaaa 120
tttcttggtc ctcttttct gatatgaaac caaattggag gttagatcat ccagaaagag 180
aattcagtgt ttccagttt tccaacctgc ttgctcataa gaatgacttg gagtggtaga 240
tcttgattca gtcgttctga ggatagcaca aagaatttgt attttagca aacactctcc 300
atgattatag tattatatgg gaattaaaact taaaccttct taaaataaag ccccccaagtt 360
tgacccatta gctcagctat agaattacig aatattttta gtatggcaat actgtcaaga 420
aaaagcactt tataatgtgc taaaatttct ttcttcctt tccttcttt ctttcttct 480
ttctttcttt ctttcttct ttctttttgg aaaagttaa ggctatataa aaaatagaga 540
gaatgggct tctcgctatg ctcagcctgt gtgtcatcat tactgtcatg ctggccattg 600
ttctctgctg ctgtgcccgg gccctgagge ctccttcacc tctatcccc caaccactat 660
ccagtcagtt tgctgctgct tccgtggttc acatgaggca gatgaggagt ttgatgcatg 720
ctgggtgaca tgctcaaca agccagagat agatgcctgg gaattgcata aagaattgaa 780
cacacttgct ggctatgacc tggttccaga accccaaatc attgatgttgc ttgcgcaggc 840
atgcagacag ttcgatgctt tccctaggc agttgcattc ctagagggttgc ttaaggacaa 900
ggcaggacct cataagaaaa tgtcatccaa gaactcagac caactttaaa tgaattggga 960
atccccactc cagaggacct aggcttagac aaagtgtgaa ccccaggac aagcggttcca 1020
gggatttatt ggtattgcta cttgattgta aacactcccc tggaaatgct gatgataaca 1080
tgttaccta tttgaacacc ttttctta ttgaataccw aaccatgtta tggtaacttg 1140
gactttaata aaaggaaaat gagttgaac t 1171

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

3/6

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 2

gtttttttt tttttta

17

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

gtttttttt ttttttc

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

4/6

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gtttttttt ttttttg

17

<210> 5

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

tcatgcagac

10

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

5/6

Synthesized Primer Sequence

<400> 6

gcagacagtt cgatgcttt cc

22

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 7

ttttcttatg aggtcctgcc ttg

23

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Probe Sequence

6/6

<400> 8

agggcagttt gcatcctaaa ggttgttaag g

31

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 9

gcttgccct ggggttcaca ctt

23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02733

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 5-9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
"Methods of examining allergic diseases" as set forth in claims 5 to 9 pertain to diagnostic methods practiced on the human body.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/02733

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12Q1/68,
G01N33/50 // A61K31/00, A61P37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/11-15/62, C07K14/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Holroyd, Kenneth J. et al., "Asthma and Bronchial Hyperresponsiveness Linked to the XY Long Arm Pseudoautosomal Region", Genomics, September 1, 1998, Volume 52, Number 2, pages 233-235	1-4, 10-20
P, A	TAKABAYASHI, Akira et al., "Novel polymorphism in the 5'-untranslated region of the interleukin-4 gene", Journal of Human Genetics, 1999, Volume 44, Number 5, pages 352-353	1-4, 10-20

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.08.00

国際調査報告の発送日

15.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

内田俊生

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/02733

C(続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	本多一至, "スギ花粉症の免疫遺伝学的解析 HLAと連鎖したスギ花粉抗原に対する免疫抑制遺伝子の証明と解析", 福岡医学雑誌, 25.1月.1989, 第80巻, 第1号, p. 28-37	1-4, 10-20
A	棟方充, "β-アドレナリン受容体遺伝子", 現代医療, 10.3月. 1998, 第30巻, 第3号, p. 863-867	1-4, 10-20
P, A	JP, 11-332567, A (第一製薬株式会社) 7.12月.1999 (07.12.99), (ファミリーなし)	1-4, 10-20

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/02733

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 5-9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 5-9 の「アレルギー疾患の検査方法」は、人体の診断方法に該当する。

2. 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

特許協力条約

E P

U S

P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 G1-103PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP00/02733	国際出願日 (日.月.年)	26.04.00	優先日 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) 株式会社ジエノシクス倉石研究所			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 5-9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 5-9 の「アレルギー疾患の検査方法」は、人体の診断方法に該当する。
2. 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12Q1/68,
G01N33/50 // A61K31/00, A61P37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' C12N15/11-15/62, C07K14/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICSTファイル(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Holroyd, Kenneth J. et al., "Asthma and Bronchial Hyper-responsiveness Linked to the XY Long Arm Pseudoautosomal Region", Genomics, September 1, 1998, Volume 52, Number 2, pages 233-235	1-4, 10-20
P, A	TAKABAYASHI, Akira et al., "Novel polymorphism in the 5'-untranslated region of the interleukin-4 gene", Journal of Human Genetics, 1999, Volume 44, Number 5, pages 352-353	1-4, 10-20

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.08.00

国際調査報告の発送日

15.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

内田俊生

4N 8214

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	本多一至, "スギ花粉症の免疫遺伝学的解析 HLAと連鎖したスギ花粉抗原に対する免疫抑制遺伝子の証明と解析", 福岡医学雑誌, 25. 1月. 1989, 第80巻, 第1号, p. 28-37	1-4, 10-20
A	棟方充, "β-アドレナリン受容体遺伝子", 現代医療, 10. 3月. 1998, 第30巻, 第3号, p. 863-867	1-4, 10-20
P, A	JP, 11-332567, A (第一製薬株式会社) 7. 12月. 1999 (07. 12. 99), (ファミリーなし)	1-4, 10-20

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 13 December 2000 (13.12.00)	From the INTERNATIONAL BUREAU To:
<p style="margin: 0;">SHIMIZU, Hatsuhi Kantetsu Tsukuba Building 6F 1-1-1, Oroshi-machi Tsuchiura-shi Ibaraki 300-0847 JAPON</p>	
Applicant's or agent's file reference G1-103PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/02733	International filing date (day/month/year) 26 April 2000 (26.04.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

the applicant the inventor the agent the common representative

Name and Address KASHIWABARA, Tomoko Kirin Brewery Company, Ltd. Pharmaceutical Division 6-26-1, Jingumae Shibuya-ku, Tokyo 150-8011 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
Telephone No.		
Facsimile No.		
Teleprinter No.		

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person the name the address the nationality the residence

Name and Address FUJISHIMA, Tomoko Kirin Brewery Company, Ltd. Pharmaceutical Division 6-26-1, Jingumae Shibuya-ku, Tokyo 150-8011 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
Telephone No.		
Facsimile No.		
Teleprinter No.		

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:	
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Susumu Kubo Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------


PATENT COOPERATION TREATY
PCT**NOTIFICATION OF ELECTION**

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 22 November 2000 (22.11.00)	
International application No. PCT/JP00/02733	Applicant's or agent's file reference G1-103PCT
International filing date (day/month/year) 26 April 2000 (26.04.00)	Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99)
Applicant NAGASU, Takeshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

07 November 2000 (07.11.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------

特許協力条約

PCT

REC'D 20 JUL 2001

WIPO PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 G 1 - 1 0 3 P C T	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPOO/02733	国際出願日 (日.月.年) 26.04.00	優先日 (日.月.年) 27.04.99
国際特許分類 (IPC) Int. C17 C12N15/12, C07K14/47, 16/18, C12Q1/68, G01N33/50 // A61K31/00, A61P37/00		
出願人（氏名又は名称） 株式会社ジェノシクス創薬研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>4</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。 （PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照） この附属書類は、全部で <u> </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 07.11.00	国際予備審査報告を作成した日 05.07.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 内田俊生印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
	4B 8214

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第6条（PCT14条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17）

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____ ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____ 項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____ ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____ ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____ ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1. における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。）

III. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に關して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

国際出願全体
 請求の範囲 5-9

理由：

この国際出願又は請求の範囲 5-9 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 5-9 の「アレルギー疾患の検査方法」は、人体の診断方法に該当する。

明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 _____ の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

全部の請求の範囲又は請求の範囲 _____ が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

請求の範囲 5-9 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。
 フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1 - 4, 10 - 20有
無

進歩性 (I S)

請求の範囲 1 - 4, 10 - 20有
無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1 - 4, 10 - 20有
無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : Holroyd, Kenneth J. et al., "Asthma and Bronchial Hyperresponsiveness Linked to the XY Long Arm Pseudoautosomal Region", Genomics, September 1, 1998, Volume 52, Number 2, pages 233-235

文献2 : 本多一至, "スギ花粉症の免疫遺伝学的解析 HLAと連鎖したスギ花粉抗原に対する免疫抑制遺伝子の証明と解析", 福岡医学雑誌, 25.1月.1989, 第80巻, 第1号, p. 28-37

文献3 : 棟方充, "β-アドレナリン受容体遺伝子", 現代医療, 10.3月.1998, 第30巻, 第3号, p. 863-867

請求の範囲 1 - 4, 10 - 20

請求の範囲 1 - 4, 10 - 20 に記載の発明は、国際調査報告で引用した文献1-3に対して、新規性及び進歩性を有する。

文献1-3には、特定の遺伝子とスギ花粉症、気管支喘息等のアレルギー疾患との関係についての記載はあるものの、本国際出願における花粉症関連遺伝子は、文献1-3に記載された遺伝子とは全く相異するものであり、当該技術分野の専門家にとって自明なものでもない。

ST
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference G1-103PCT	FOR FURTHER ACTION		SeeNotificationofTransmittalofInternational Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/02733	International filing date (day/month/year) 26 April 2000 (26.04.00)	Priority date (day/month/year) 27 April 1999 (27.04.99)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12Q 1/68, G01N 33/50 // A61K 31/00, A61P 37/00			
Applicant GENOX RESEARCH, INC.			

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 07 November 2000 (07.11.00)	Date of completion of this report 05 July 2001 (05.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

I. Basis of the report1. With regard to the **elements** of the international application:*

the international application as originally filed
 the description:

pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

the claims:

pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

the drawings:

pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
 the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

contained in the international application in written form.
 filed together with the international application in computer readable form.
 furnished subsequently to this Authority in written form.
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
 The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____
 the claims, Nos. _____
 the drawings, sheets/fig. _____

5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.
 claims Nos. 5-9

because:

the said international application, or the said claims Nos. 5-9 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet for continuation of Box III. 1.

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
 no international search report has been established for said claims Nos. 5-9.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
 the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/02733

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1.

The "test method for allergies" of Claims 5-9
pertains to diagnostic methods practised on the human
body.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/02733

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-4, 10-20	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-4, 10-20	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-4, 10-20	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Kenneth J. Holroyd et al., "Asthma and bronchial hyperresponsiveness linked to the XY long arm pseudoautosomal region", Genomics, 1 September 1998, Vol. 52, No. 2, pp. 233-235

Document 2: Kazushi Honda, "Immunogenetic analysis of Japanese cedar pollinosis. Demonstration and analysis of an immunosuppressant gene towards the cedar pollen antigen linked with HLA", Fukuoka Igaku Zasshi, 25 January 1989, Vol. 80, No. 1, pp. 28-37 [in Japanese]

Document 3: Mitsuru Munakata, "The β -adrenaline receptor gene". Gendai Iryo, 10 March 1998, Vol. 30, No. 3, pp. 863-867 [in Japanese]

Claims 1-4 and 10-20

The inventions described in Claims 1-4 and 10-20 are novel and involve an inventive step relative to Documents 1-3, cited in the international search report.

Documents 1-3 disclose associations between specified genes and allergies such as Japanese cedar pollinosis and bronchial asthma; however, the gene associated with pollinosis in the present international

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/02733

application is completely different from the genes disclosed in Documents 1-3, and is not obvious to a person skilled in the art.